

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP04/019677

International filing date: 21 December 2004 (21.12.2004)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP
Number: 2003-430898
Filing date: 25 December 2003 (25.12.2003)

Date of receipt at the International Bureau: 10 February 2005 (10.02.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

21.12.2004

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 3 年 1 2 月 2 5 日
Date of Application:

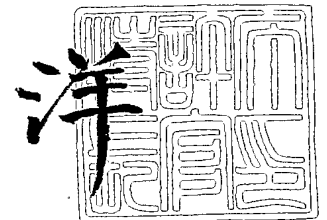
出 願 番 号 特 願 2 0 0 3 - 4 3 0 8 9 8
Application Number:
[ST. 10/C] : [J P 2 0 0 3 - 4 3 0 8 9 8]

出 願 人 株 式 会 社 島 津 製 作 所
Applicant(s):

2 0 0 5 年 1 月 2 8 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川



【書類名】 特許願
【整理番号】 K1030635
【提出日】 平成15年12月25日
【あて先】 特許庁長官殿
【国際特許分類】 G01N 30/00
【発明者】
 【住所又は居所】 京都府京都市中京区西ノ京桑原町 1 番地 株式会社島津製作所内
 【氏名】 渡辺 真
【発明者】
 【住所又は居所】 京都府京都市中京区西ノ京桑原町 1 番地 株式会社島津製作所内
 【氏名】 松尾 英一
【発明者】
 【住所又は居所】 京都府京都市中京区西ノ京桑原町 1 番地 株式会社島津製作所内
 【氏名】 戸田 千香子
【発明者】
 【住所又は居所】 京都府京都市中京区西ノ京桑原町 1 番地 株式会社島津製作所内
 【氏名】 西村 紀
【特許出願人】
 【識別番号】 000001993
 【氏名又は名称】 株式会社 島津製作所
【代理人】
 【識別番号】 100100561
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 岡田 正広
【手数料の表示】
 【予納台帳番号】 064002
 【納付金額】 21,000円
【提出物件の目録】
 【物件名】 特許請求の範囲 1
 【物件名】 明細書 1
 【物件名】 図面 1
 【物件名】 要約書 1

【書類名】 特許請求の範囲**【請求項 1】**

π 電子含有基を有するアミノ酸残基を含むタンパク質又はペプチドを、 π 電子含有基を有する担体を用いて分離する、タンパク質又はペプチドの濃縮分離法。

【請求項 2】

前記 π 電子含有基を有するアミノ酸残基がトリプトファン残基である、請求項 1 に記載のタンパク質又はペプチドの濃縮分離法。

【請求項 3】

π 電子含有化合物により修飾された、 π 電子含有修飾基を有するアミノ酸残基を含むタンパク質又はペプチドを、 π 電子含有基を有する担体を用いて分離する、タンパク質又はペプチドの濃縮分離法。

【請求項 4】

前記アミノ酸残基がトリプトファン残基である、請求項 3 に記載のタンパク質又はペプチドの濃縮分離法。

【請求項 5】

前記 π 電子含有化合物が、 π 電子を有するスルフェニル化合物である、請求項 3 又は 4 に記載のタンパク質又はペプチドの濃縮分離法。

【請求項 6】

前記スルフェニル化合物が、2-ニトロベンゼンスルフェニルクロリドである、請求項 3～5 のいずれか 1 項に記載のタンパク質又はペプチドの濃縮分離法。

【請求項 7】

前記 π 電子含有基を有する担体の π 電子含有基がフェニル基である、請求項 1～6 のいずれか 1 項に記載のタンパク質又はペプチドの濃縮分離法。

【請求項 8】

π 電子含有基を有するアミノ酸残基を含むタンパク質又はペプチドを断片化し、 π 電子含有基を有するアミノ酸残基を含むペプチド断片と、 π 電子含有基を有しないペプチド断片とを含む断片化試料液を得て、

前記断片化試料液を、 π 電子含有基を有する担体と接触させて、前記 π 電子含有基を有するアミノ酸残基を含むペプチド断片と前記 π 電子含有基を有しないペプチド断片とを分離する、ペプチドの濃縮分離法。

【請求項 9】

タンパク質又はペプチドを π 電子含有化合物によって修飾し、 π 電子含有修飾基を有するアミノ酸残基を含むタンパク質又はペプチド試料液を得て、

前記 π 電子含有修飾基を有するアミノ酸残基を含むタンパク質又はペプチドを断片化し、 π 電子含有基を有するアミノ酸残基を含むペプチド断片と、 π 電子含有基を有しないペプチド断片とを含む断片化試料液を得て、

前記断片化試料液を、 π 電子含有基を有する担体と接触させて、前記 π 電子含有基を有するアミノ酸残基を含むペプチド断片と前記 π 電子含有基を有しないペプチド断片とを分離する、ペプチドの濃縮分離法。

【書類名】明細書

【発明の名称】タンパク質又はペプチドの濃縮分離法

【技術分野】

【0001】

本発明は、プロテオミクス分野すなわちタンパク質の網羅的解析分野に関する。

【背景技術】

【0002】

これまでプロテオミクス分野すなわちタンパク質網羅的解析分野において、二次元電気泳動法と質量分析計とを併用したPMF (Peptide Mass Fingerprinting; ペプチドマスフィンガープリンティング) 法による解析が主流とされてきた。そして、タンパク質の相対定量解析の手法としては、二次元電気泳動を用いたディファレンシャルディスプレイ法が用いられてきた。しかし、タンパク質分離やゲル染色の再現性、タンパク質の溶解性などの点において問題がある。この問題を解決するべく、次世代のタンパク質解析法として、安定同位体を用いたタンパク質の網羅的解析法が考案されている。

【0003】

一方、スルフェニル化合物は、トリプトファン残基の選択的ラベル化試薬として知られている。その中でも、酸性溶液中でトリプトファン残基を選択的に化学修飾する試薬としてNBSC1 (2-ニトロベンゼンスルフェニルクロリド) 試薬が、Scoffone E, Fontana A, Rocchi R., Biochem. Biophys. Res. Comm., 1966, 25, 170及びScoffone E, Fontana A, Rocchi R., Biochemistry, 1968, 7, 971によって報告されている。

【0004】

そして、Hiroki Kuyama, Makoto Watanabe, Chikako Toda, Eiji Ando, Koichi Tanaka, Osamu Nishimura, Rapid Commun. Mass Spectrom., 2003, 17, 1642-1650によると、正常ラットと高血糖ラットとの二系統の生体試料サンプルをそれぞれ用意し、そのうち一方のサンプル中のタンパク質に含有されるトリプトファンをNBSC1試薬で、他方のサンプル中のタンパク質に含有されるトリプトファンをNBSC1試薬の¹³C同位体標識体でそれぞれ化学修飾し、その後、化学修飾されたそれぞれのサンプルを混合してトリプシンで酵素消化し、トリプトファン含有ペプチドを分離し、質量分析計を用いて6Daの質量差を持つペアピークとして検出されたペプチドの相対定量解析及びシーケンス解析を行ったことが報告されている。なお、トリプトファン含有ペプチドの分離は、ODSカラムもしくはSephadexLH-20を用いた逆相分離により行っている。

【0005】

また一方、2001/2002 YMC GENERAL CATALOG HPLC COLUMN & GEL (株式会社ワイエムシイ) に記載されている、 π 電子含有基としてフェニル基を有する担体が知られている。

【0006】

【非特許文献1】スコフォン・E (Scoffone E)、フォンタナ・A (Fontana A) 及びロッチ・R (Rocchi R) 著、「バイオケミカル・アンド・バイオフィジカル・リサーチ・コミュニケーションズ (Biochemical and Biophysical Research Communications)」、1966年、第25巻、p. 170

【非特許文献2】スコフォン・E (Scoffone E)、フォンタナ・A (Fontana A) 及びロッチ・R (Rocchi R) 著、「バイオケミストリー (Biochemistry)」、1968年、第7巻、p. 971

【非特許文献3】九山浩樹 (Hiroki Kuyama)、渡辺真 (Makoto Watanabe)、戸田千香子 (Chikako Toda)、安藤英治 (Eiji Ando)、田中耕一 (Koichi Tanaka) 及び西村紀 (Osamu Nishimura) 著、「ラピッド・コミュニケーションズ・イン・マス・スペクトロメトリー (Rapid Communications in Mass Spectrometry)」、2003年、第17巻、p. 1642-1650

【非特許文献4】分析用カラムPh YMC Pack Ph、「2001/2002 YMC GENERAL CATALOG HPLC COLUMN & GEL」p. 52; 株式会社ワイエムシイ

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

そこで本発明の目的は、濃縮分離すべきタンパク質又はペプチドに対して優れた選択的保持能力を持つ担体を見出し、それを用いてタンパク質又はペプチドをより選択的に濃縮分離する方法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明者らは、 π 電子性化合物間に働く π - π 電子相互作用に起因する固有の選択性をタンパク質又はペプチドの濃縮分離に利用することによって上記本発明の目的が達成できることを見出し、本発明を完成するに至った。すなわち本発明は、 π 電子性基含有アミノ酸残基を有するタンパク質又はペプチドの π 電子と、担体が有する π 電子との相互作用によって、 π 電子性基含有アミノ酸残基を有するタンパク質又はペプチドを選択的に分離することができるという原理に基づいている。

本発明は、以下の発明を含む。

(1) π 電子含有基を有するアミノ酸残基を含むタンパク質又はペプチドを、 π 電子含有基を有する担体を用いて分離する、タンパク質又はペプチドの濃縮分離法。

(2) 前記 π 電子含有基を有するアミノ酸残基がトリプトファン残基である、前記(1)に記載のタンパク質又はペプチドの濃縮分離法。

【0009】

(3) π 電子含有化合物により修飾されたアミノ酸残基を含むタンパク質又はペプチドを、 π 電子含有基を有する担体を用いて分離する、タンパク質又はペプチドの濃縮分離法。

(4) 前記アミノ酸残基がトリプトファン残基である、前記(3)に記載のタンパク質又はペプチドの濃縮分離法。

(5) 前記 π 電子含有化合物が、 π 電子を有するスルフェニル化合物である、前記(3)又は(4)に記載のタンパク質又はペプチドの濃縮分離法。

(6) 前記スルフェニル化合物が、2-ニトロベンゼンスルフェニルクロリドである、前記(3)～(5)のいずれかに記載のタンパク質又はペプチドの濃縮分離法。

【0010】

(7) 前記 π 電子含有基を有する担体の π 電子含有基がフェニル基である、前記(1)～(6)のいずれかに記載のタンパク質又はペプチドの濃縮分離法。

【0011】

(8) π 電子含有基を有するアミノ酸残基を含むタンパク質又はペプチドを断片化し、 π 電子含有基を有するアミノ酸残基を含むペプチド断片と、 π 電子含有基を有しないペプチド断片とを含む断片化試料液を得て、

前記断片化試料液を、 π 電子含有基を有する担体と接触させて、前記 π 電子含有基を有するアミノ酸残基を含むペプチド断片と前記 π 電子含有基を有しないペプチド断片とを分離する、ペプチドの濃縮分離法。

【0012】

(9) タンパク質又はペプチドを π 電子含有化合物によって修飾し、 π 電子含有修飾基を有するアミノ酸残基を含むタンパク質又はペプチド試料液を得て、

前記 π 電子含有修飾基を有するアミノ酸残基を含むタンパク質又はペプチドを断片化し、 π 電子含有基を有するアミノ酸残基を含むペプチド断片と、 π 電子含有基を有しないペプチド断片とを含む断片化試料液を得て、

前記断片化試料液を、 π 電子含有基を有する担体と接触させて、前記 π 電子含有基を有するアミノ酸残基を含むペプチド断片と前記 π 電子含有基を有しないペプチド断片とを分離する、ペプチドの濃縮分離法。

【発明の効果】

【0013】

本発明によると、濃縮分離すべきタンパク質又はペプチドに対して優れた選択的保持能力を持つ担体を用いて、タンパク質又はペプチドをより選択的に濃縮分離する方法を提供することが可能となる。また、本発明の方法を用いると、質量分析計を用いたペプチド又はタンパク質の相対定量及びシーケンス解析を含む、多様な生体試料中のタンパク質の網羅的解析をより効率的かつ正確に行うことが可能となる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0014】

本発明は、タンパク質又はペプチドのクロマトグラフィーを用いた濃縮分離において、濃縮分離すべきタンパク質又はペプチド中のアミノ酸残基が有する π 電子性基と固定相の担体が有する π 電子性基との間に働く π - π 電子相互作用を利用する方法である。

【0015】

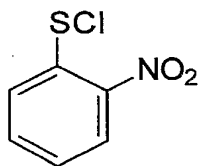
本発明においては、 π 電子含有基を有するアミノ酸残基を含むタンパク質又はペプチドが選択的に濃縮分離される。 π 電子含有基としては特に限定されないが、芳香族炭化水素基であることが好ましい。また本発明においては、前記 π 電子含有基を有するアミノ酸残基がトリプトファン残基であることが特に好ましい。トリプトファン残基のタンパク質中の含有量は、アミノ酸残基の中でも最も少ない部類に属するため、本発明の方法によって得られるマススペクトルが単純となり、その解析が容易となる。

【0016】

また本発明における前記 π 電子含有基を有するアミノ酸残基は、タンパク質又はペプチドのアミノ酸残基をあらかじめ π 電子含有化合物で修飾したものであってもよい。修飾のための π 電子含有化合物としては、スルフェニル化合物であることが好ましい。スルフェニル化合物は、上述した好ましいアミノ酸残基であるトリプトファン残基を選択的に修飾することができる。スルフェニル化合物としては、一般式 $R-S-X$ (R は有機基、 X は脱離基を表す。)で表されるものであれば特に限定されないが、有機基 R が芳香族炭化水素基であることが好ましい。例えば、2-ニトロベンゼンスルフェニルクロリド、4-ニトロベンゼンスルフェニルクロリド、2,4-ベンゼンスルフェニルクロリド、2-ニトロ-4-カルボキシベンゼンスルフェニルクロリドなどが挙げられる。本発明においては、下記構造式に示す2-ニトロベンゼンスルフェニルクロリドを用いることが特に好ましい。

【0017】

【化1】



【0018】

一方、上述のような π 電子性基含有アミノ酸残基を含むタンパク質又はペプチドを分離するための担体は、 π 電子含有基を有する。担体が有する π 電子含有基としては特に限定されないが、芳香族炭化水素基であることが好ましく、例えばフェニル基などのものが用いられる。このような担体を用いることは、疎水的相互作用に加えて π - π 電子相互作用を利用することができる点で好ましい。本発明においては、上記担体に、 π 電子性基を有するタンパク質又はペプチドを接触させて用いる。具体的には、フェニル基を有する担体を固定相として充填したYMC-PackPh (ワイウムシ社製) カラムなどを用いることができる。

【0019】

本発明は、例えば質量分析計を用いたペプチド又はタンパク質の相対定量及びシーケンス解析を含む、多様な生体試料中のタンパク質の網羅的解析に用いることができる。例え

ば、上記スルフェニル化合物の安定同位体標識体及び非標識体の2種類のラベル化試薬を調製する。別途、2系統（例えば、正常細胞及びガン細胞）の生体試料を用意し、上記2種のスルフェニル化合物のうち安定同位体標識体を用いていずれか一方の系統の試料を、非標識体を用いていずれか他方の系統の試料をそれぞれトリプトファンラベル化処理する。ラベル化処理されたそれぞれの試料を混合し、断片化を行い、ラベル化ペプチド断片と非ラベル化ペプチド断片との混合物を得る。

【0020】

その後、得られたペプチド断片混合物からラベル化ペプチド断片を分離する。本発明は、この分離の際に有用に用いることができる。すなわち、例えばフェニル基を有する担体を用い、前記ペプチド断片の混合物中のラベル化ペプチド断片を選択的に吸着させ、その他の非ラベル化ペプチド断片を洗浄する。その後、吸着したラベル化ペプチド断片を溶出させることによって選択的に分離を行うことができる。分離されたラベル化ペプチドには、安定同位体標識体によるラベル化体及び非標識体によるラベル化体の2種類のラベル化体が含まれている。従って、それらは質量分析計によって、2種類のラベル化試薬の質量数の差に相当する6 Daの幅と2種類のラベル化体の相対量比に相当する面積比とを有するペアピークとして検出することができる。検出されたペアピークからは、相対定量解析及びシーケンス解析を行うことができる。

【0021】

従来のセファデックス逆相分離による方法は、実際の生体試料に対し分解能及び再現性においてばらつきが生じる場合もあったが、本発明の方法によってこれらの点が改善された。従って本発明の方法は、従来の方法に比べ実用性に優れ、より効率的かつ正確なタンパク質解析を行うことが可能となる。

【実施例】

【0022】

以下に実施例により本発明をさらに詳しく説明するが、本発明はこれらにより限定されるものではない。また、特に断りのない限り、%で表される量は重量基準である。

【0023】

サンプルとしてはCrj: Wistarラット及びGK/Crj (Goto-Kakizaki)ラット（ともに日本チャールズリバー・ジャパン社製）の2種類の血清を用いた。

【0024】

(a) サンプルの処理

Crj: Wistarラット血清50 μ lを、アルブミン・グロブリン除去キット (Aurum Serum Protein Mini Kit、バイオラッド社製) を用いて前処理を行った。その後、BCA法に基づきタンパク質定量を行い、総タンパク量が100 μ gとなるようにサンプル液を調製した。サンプル液15 μ lを、0.1% SDS、5mM EDTAの水溶液に溶解し、沸騰水中で5分間煮沸し、その後、水中で冷却する処理を行った。

別途、NBSC1試薬（2-ニトロ [$^{12}\text{C}_6$] ベンゼンフルフェニルクロリド；以下 (^{12}C) NBSC1と表記する。）を用意した。0.17mgの (^{12}C) NBSC1試薬を溶解した酢酸溶液35 μ lを、上記処理を行ったサンプル液に加え、暗所において室温で終夜静置した。このようにして、Crj: Wistarラット血清の (^{12}C) ラベル化体を得た。

【0025】

GK/Crj (Goto-Kakizaki)ラット血清50 μ lを、アルブミン・グロブリン除去キット (Aurum Serum Protein Mini Kit、バイオラッド社製) を用いて前処理を行った。その後、BCA法に基づきタンパク質定量を行い、総タンパク量が100 μ gとなるようにサンプル液を調製した。サンプル液15 μ lを、0.1% SDS、5mM EDTAの水溶液に溶解し、沸騰水中で5分間煮沸し、その後、水中で冷却する処理を行った。

別途、上記 (^{12}C) NBSC1の ^{13}C 安定同位体標識体（2-ニトロ [$^{13}\text{C}_6$] ベンゼンフルフェニルクロリド；以下 (^{13}C) NBSC1と表記する。）を用意した。0.17mgの (^{13}C) NBSC1試薬を溶解した酢酸溶液35 μ lを、上記処理を行ったサンプル液に加え、暗所において室温で終夜静置した。このようにして、GK/Crj (Goto-Kakizaki)ラット

血清の (^{13}C) ラベル化体を得た。

【0026】

上述のようにして得られたそれぞれのラベル化体を混合し、混合サンプルとした。これを Sephadex LH-20 (ファルマシア社製) を用いて脱塩し、遠心エバポレーターによって乾固させた。

【0027】

50mM Tris-HCl (pH 8.6), 0.01% SDS 水溶液 44 μl を乾固させた混合サンプルに加えて混合サンプルを溶解し、さらに 4 μl の 4mM TCEP (トリス (2-カルボキシエチル) ホスフィン塩酸塩) 水溶液を加え、37℃で30分間放置し、その後、500mM ヨードアセトアミド水溶液 1 μl を加えて暗所において室温で45分間静置した。

【0028】

2 μg のトリプシンを溶解した 50mM Tris-HCl (pH 7.8) の 5mM CaCl_2 水溶液 450 μl を混合サンプルに加え、37℃で16時間静置し、酵素消化を行った。

【0029】

上記の処理を行った混合サンプルについて脱塩チップ (ZipTip C18; ミリポア社製) を用いて脱塩し、MALDI-TOF MS で測定した。このとき得られたスペクトルチャートを図 1 (ラベル化トリプトファン残基を有するペプチド断片の濃縮前 (Before enrichment of peptide fragments containing labeled Tryptophan residue)) に示す。図 1 中、横軸は質量/電荷 (Mass/Charge)、縦軸はフラグメントイオンの強度を表す。

【0030】

(b) ラベル化トリプトファン含有ペプチドの濃縮

まず、50mM KH_2PO_4 / CH_3CN / MeOH = 68/6/26 水溶液で YMC-Pack Ph 充填剤 (ワイエムシイ社製) を終夜膨潤し、膨潤した YMC-Pack Ph スラリーゲルを、ゲルの体積が 1ml となるように充填した。

【0031】

次に、前述の (a) の手順で得られた混合サンプルについて遠心エバポレーターを用いて乾固させた後、洗浄バッファ (Wash Buffer; 50mM KH_2PO_4 / CH_3CN / MeOH = 68/6/26 水溶液) 100 μl に再溶解した。得られたサンプル溶液を、前述の (b) の手順で得られたカラム (フェニルカラム (Phenyl column)) にアプライした。移動相としては、Wash Buffer を適用し、シリンジを用いて流速が 6 滴/分 (1 滴 = 約 25 μl) となるようにした。この際、1 フラクシオンの体積は 500 μl になるようにした。この条件で最終的に 12 フラクシオンを分画した。このようにして、移動相に Wash Buffer を用いて分画することにより 12 のフラクション (Wash fraction (1)-(12)) を得た。

【0032】

さらに、移動相を溶出バッファ (Elute Buffer; 50mM KH_2PO_4 / CH_3CN / MeOH = 4/18/78 水溶液) に変えてカラムに通し、ラベル化トリプトファン含有ペプチドを溶出した。このとき流速は 6 滴/分 (1 滴 = 約 25 μl) となるようにし、1 フラクシオンの体積は 500 μl になるようにした。このようにして、移動相に Elute Buffer を用いて分画することによりラベル化トリプトファン含有ペプチドの 5 つの溶出フラクション (Elute Fraction (1)-(5)) を得た。

【0033】

Wash Buffer、Elute Buffer の順で分画した各フラクションのサンプル溶液について遠心エバポレーターを用いて乾固させた後、それぞれを 0.1% TFA (トリフルオロ酢酸) 水溶液 100 μl に再溶解し、脱塩チップ (ZipTip C18、ミリポア社製) を用いて脱塩した。

【0034】

このようにして得られた各フラクションのサンプルを、MALDI-TOF MS によって測定した。このとき得られたスペクトルチャートを、図 2 ~ 4 に示す (フェニルカラムによるラベル化トリプトファン残基含有ペプチド断片の濃縮 (Enrichment of peptides fragments containing labeled Tryptophan residue with Phenyl column))。これらの図においては、横軸に質量/電荷 (Mass/Charge)、縦軸にフラグメントイオンの強度を表す。

【0035】

図2は、前記Wash Bufferによる12の洗浄フラクションのうち1番目のフラクション(Fr.1)～6番目のフラクション(Fr.6) (Wash Fraction (1)-(6)) のスペクトルチャートである。図3は、前記Wash Bufferによる12の洗浄フラクションのうち7番目のフラクション(Fr.7)～12番目のフラクション(Fr.12) (Wash Fraction (7)-(12)) のスペクトルチャートである。

【0036】

図4-aは、前記Elute Bufferによる1番目のフラクション(Fr.1)～5番目のフラクション(Fr.5)の5つの溶出フラクション (Elute Fraction(1)-(5)) のスペクトルチャートである。図4-aにおける矢印は、NBSC1ラベル化トリプトファン含有ペプチド断片のペアピークを指す。そのペアピークの一对を図4-bに拡大して示す。図4-bが示すように、このペアピークは、(^{12}C) NBSC1ラベル化トリプトファン含有ペプチド断片と(^{13}C) NBSC1ラベル化トリプトファン含有ペプチド断片との質量差に相当する6Daの質量差、及び混合比に相当する1:2のピーク面積比を有する。このようなペアピークは、溶出フラクション(1)～(5)においてのみ検出された。

【0037】

これらの図が示すように、本発明の方法を用いることによって、目的のラベル化トリプトファン含有ペプチド断片を溶出フラクションに選択的に溶出することができた。

【図面の簡単な説明】

【0038】

【図1】 本実施例で得られた、ラベル化トリプトファン残基を有するペプチド断片の濃縮前のMALDI-TOF MSスペクトルチャートである。

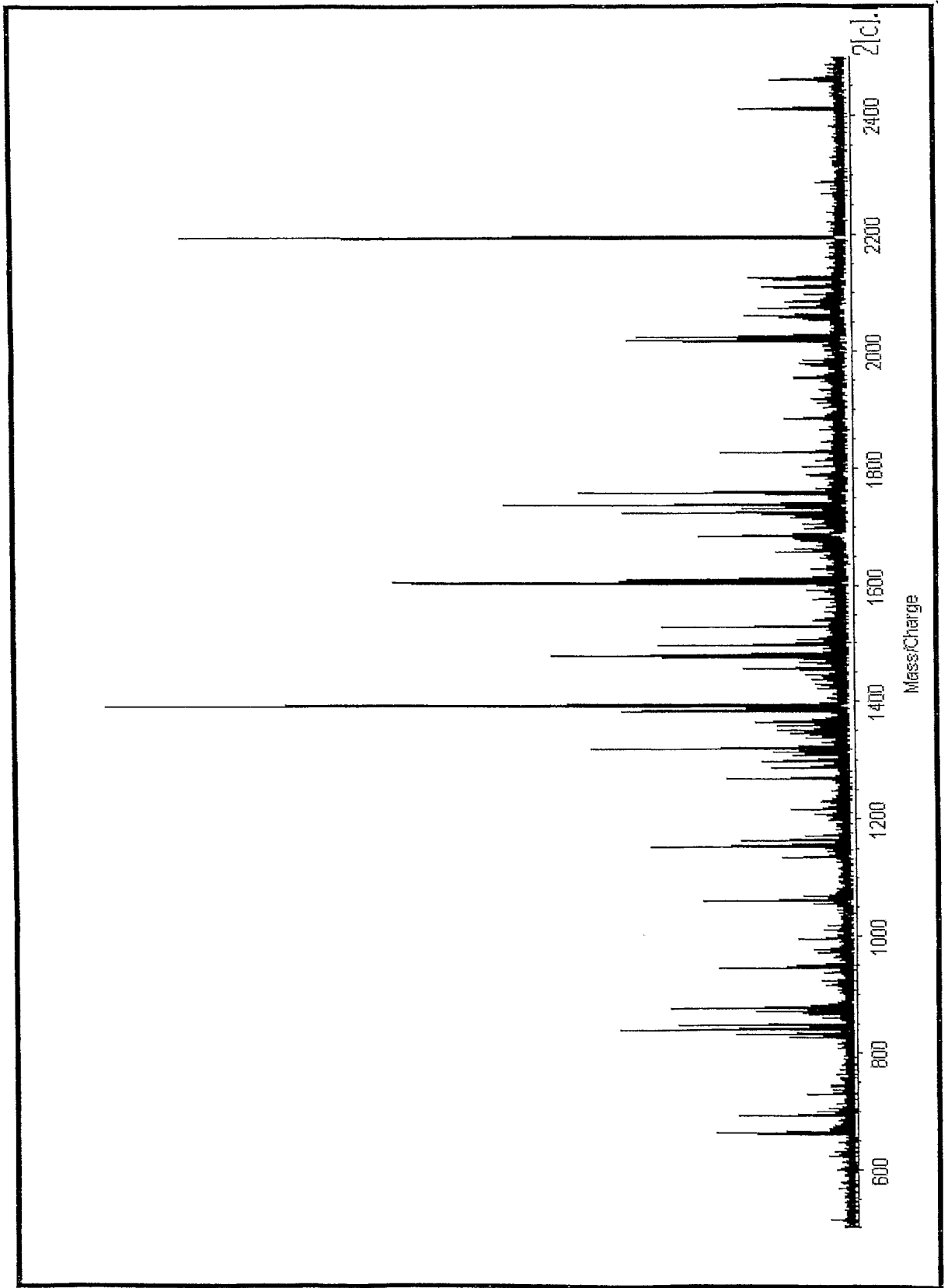
【図2】 本実施例で得られた、洗浄バッファによる12の洗浄フラクションのうち、1番目のフラクション～6番目のフラクションのMALDI-TOF MSスペクトルチャートである。

【図3】 本実施例で得られた、洗浄バッファによる12の洗浄フラクションのうち、7番目のフラクション～12番目のフラクションのMALDI-TOF MSスペクトルチャートである。

【図4】 本実施例で得られた、溶出バッファによる1番目のフラクション～5番目のフラクションの5つの溶出フラクションのMALDI-TOF MSスペクトルチャート(a)、及び、(a)中の矢印が示すペアピークの1つの拡大図(b)である。

【書類名】 図面
【図 1】

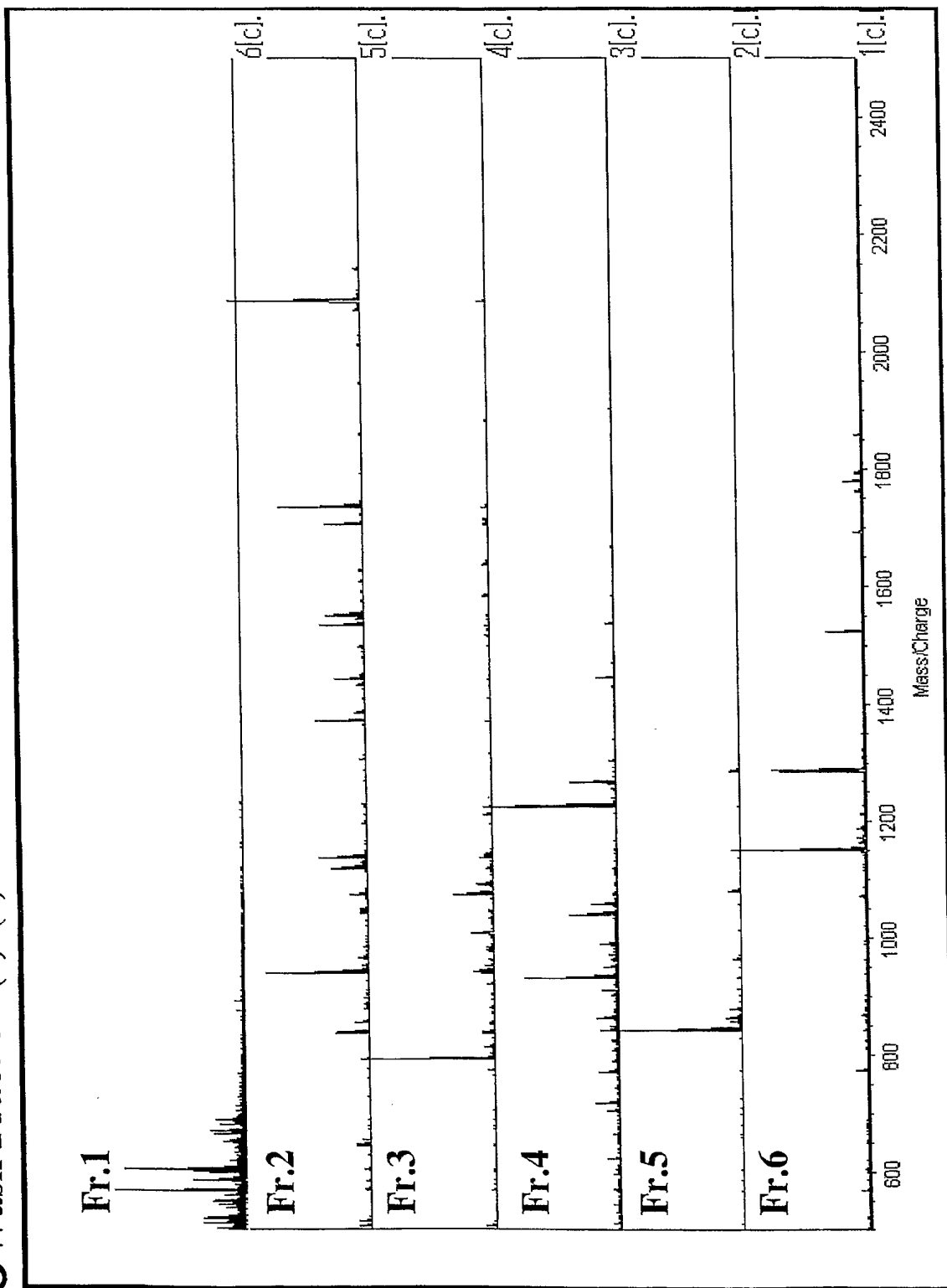
● Before enrichment of peptide fragments containing labeled Tryptophhan residue



● Enrichment of peptides fragments containing labeled Tryptophan residue
with Phenyl column

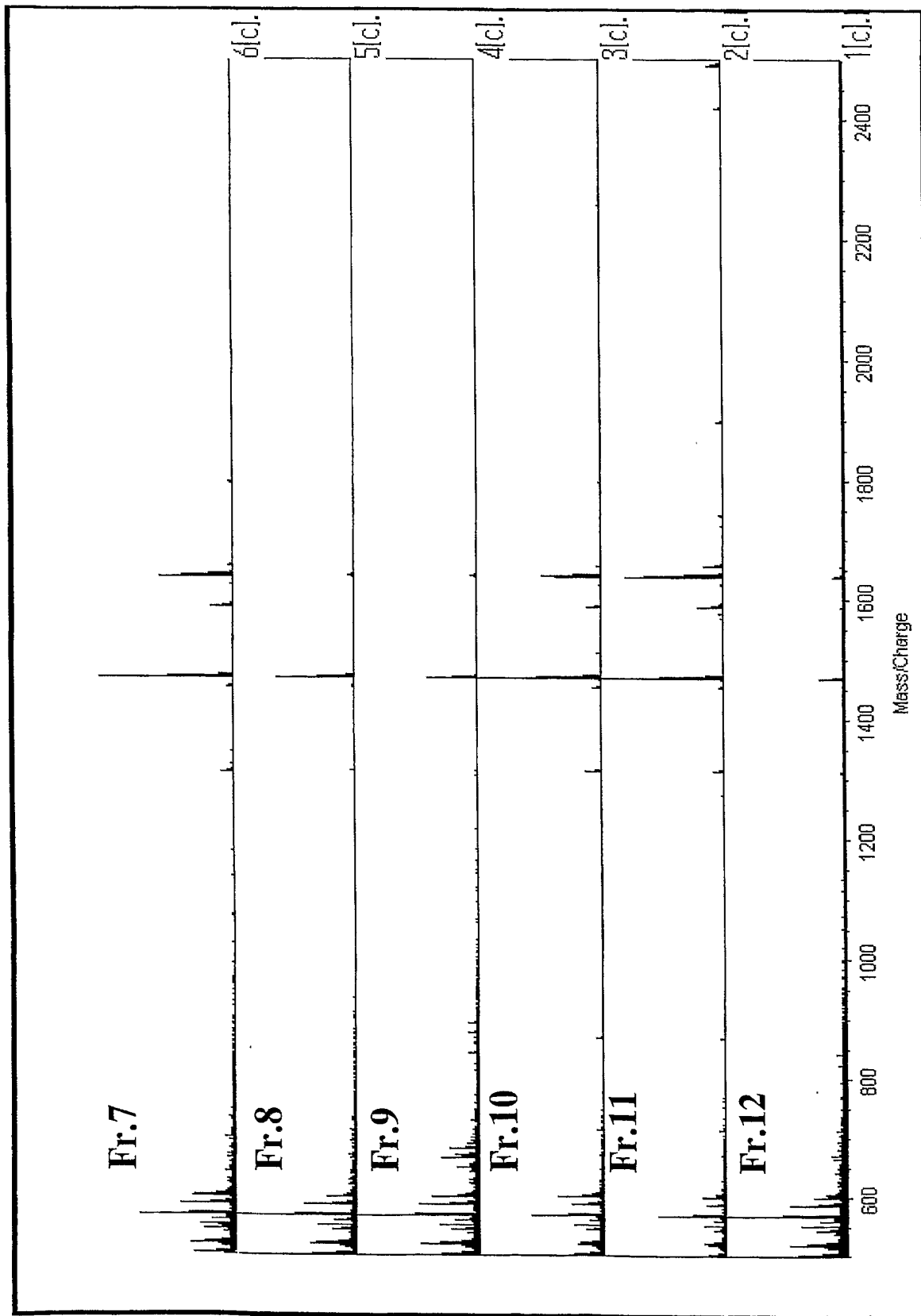
【図 2】

○ Wash Fraction (1)-(6)



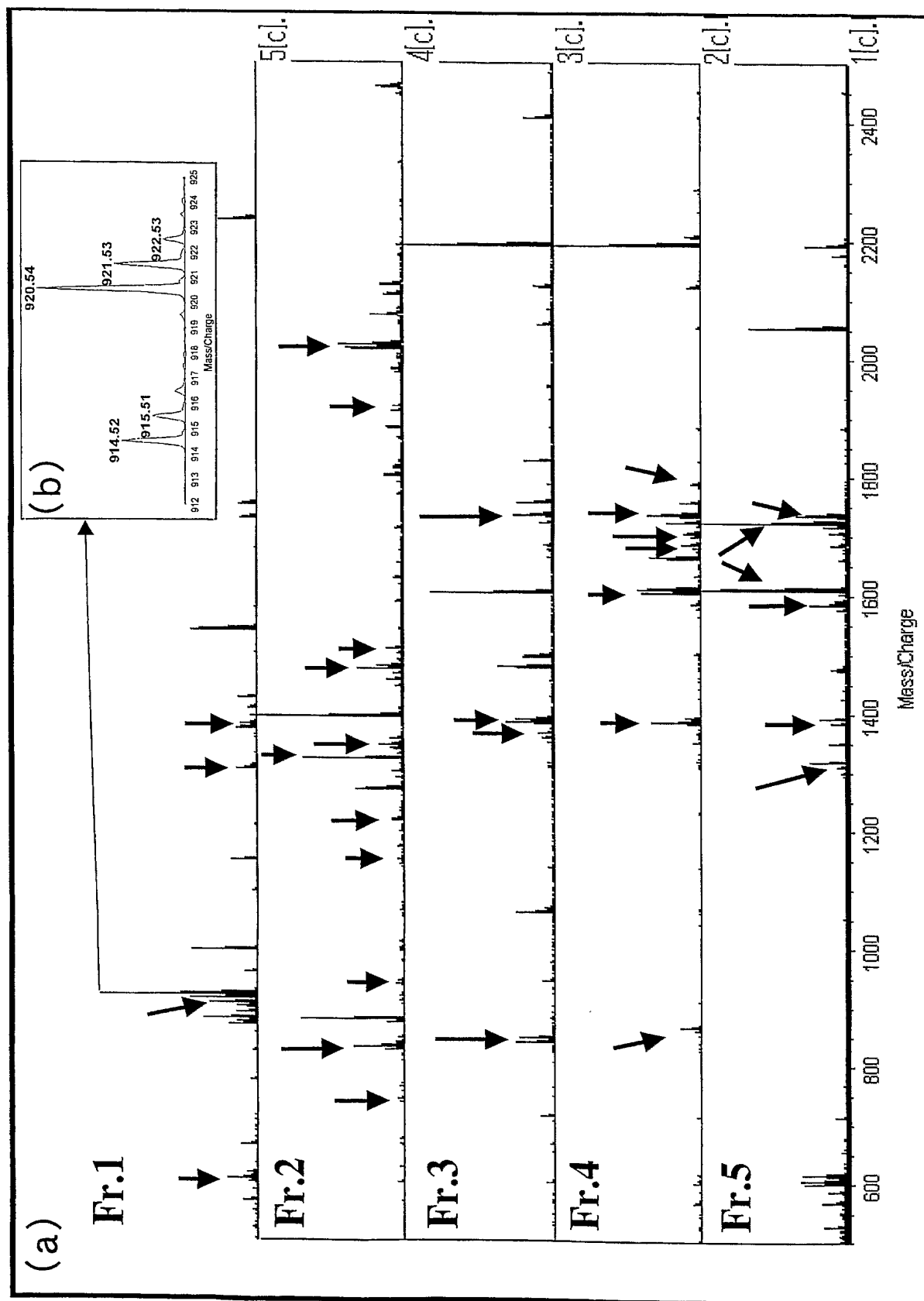
【図 3】

○Wash Fraction (7)-(12)



【図 4】

● Elute Fraction (1)-(5)



【書類名】 要約書**【要約】**

【課題】濃縮分離すべきタンパク質又はペプチドに対して優れた選択的保持能力を持つ担体を見出し、それを用いてタンパク質又はペプチドをより選択的に濃縮分離する方法を提供する。

【解決手段】 π 電子含有官能基を有するアミノ酸残基を含むタンパク質又はペプチドを、 π 電子含有官能基を有する担体を用いて分離する、タンパク質又はペプチドの濃縮分離法。好ましくは、前記アミノ酸残基はトリプトファン残基又はスルフェニル化合物によって修飾されたトリプトファン残基であり、前記担体はフェニル基を有する担体である。

【選択図】 図 4

特願 2 0 0 3 - 4 3 0 8 9 8

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[0 0 0 0 0 1 9 9 3]

1. 変更年月日

1 9 9 0 年 8 月 2 7 日

[変更理由]

新規登録

住 所

京都府京都市中京区西ノ京桑原町 1 番地

氏 名

株式会社島津製作所